

## Kecap kedelai – Bagian 1: Manis



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Komposisi .....	1
5 Syarat mutu .....	2
6 Pengambilan contoh .....	2
7 Cara uji .....	2
8 Syarat lulus uji .....	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan .....	3
Lampiran A (normatif) Cara uji kecap kedelai manis .....	4
Bibliografi .....	27



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Kecap kedelai – Bagian 1: Manis* ini merupakan revisi SNI 01 – 3543 – 1999 *Kecap kedelai*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut :

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku.
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri kecap kedelai.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada :

1. Undang-Undang Republik Indonesia No.5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No.7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen
4. Undang-Undang Republik Indonesia No.36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No.28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 722/MENKES/PER/IX/1988, tentang Bahan Tambahan Makanan atau revisinya.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24 / M-IND/ 2/ 2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang Pada Kemasan Pangan Dari Plastik.
9. Keputusan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/ M-IND/ 7/ 2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.
10. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04, Makanan dan Minuman Kementerian Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 November 2011 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Maret 2012 sampai dengan tanggal 21 Mei 2012.dengan hasil akhir RASNI.



## Kecap kedelai – Bagian 1: Manis

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji kecap kedelai manis.

Standar ini berlaku untuk kecap yang mengandung hasil fermentasi kedelai.

### 2 Acuan normative

Untuk acuan tidak bertanggal berlaku edisi terakhir (termasuk revisi dan atau amandemen)

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **kecap kedelai manis**

produk berbentuk cair yang dibuat dari cairan hasil fermentasi kedelai atau bungkil kedelai ditambah gula dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diijinkan

#### 3.2

##### **cairan hasil fermentasi**

ekstrak hasil fermentasi kedelai atau bungkil kedelai oleh kapang *Aspergillus oryzae* atau jenis kapang lain yang tidak menghasilkan mikotoksin, serta khamir dan atau bakteri bila diperlukan dengan atau tanpa penambahan enzim selama proses fermentasi dalam larutan garam

#### 3.3

##### **bungkil kedelai**

kedelai yang telah diambil sebagian minyaknya

### 4 Komposisi

#### 4.1 Bahan baku

- Kedelai atau bungkil kedelai;
- Gula;
- Garam; dan
- Air.

#### 4.2 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk kecap kedelai manis sesuai dengan ketentuan yang berlaku.



## 5 Syarat mutu

Syarat mutu kecap kedelai manis sesuai Tabel 1 di bawah ini.

**Tabel 1 – Syarat mutu kecap kedelai manis**

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal, khas
1.2	Rasa	-	Normal, khas
2	Kadar protein (Nx6,25)	% (b/b)	min. 1,0
3	Kadar gula (dihitung sebagai sakarosa)	% (b/b)	min. 30
4	pH	-	3,5 – 6,0
5	Cemaran logam		
5.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,0
5.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0
5.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,05
6	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5
7	Cemaran mikroba		
7.1	Bakteri coliform	APM/g	< 3
7.2	Kapang	koloni/g	maks. 50
8	Aflatoksin*		
8.1	B <sub>1</sub>	µg/kg	maks. 15
8.2	Total aflatoksin	µg/kg	maks. 20
<b>CATATAN:</b> * hanya untuk cairan hasil fermentasi kedelai			

## 6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

## 7 Cara uji

Cara uji untuk kecap kedelai manis adalah seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1;



- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2;
  - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
  - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
- c) Cara uji kadar protein ( $N \times 6,25$ ) sesuai Lampiran A.3;
- d) Cara uji kadar gula (dihitung sebagai sakarosa) sesuai Lampiran A.4;
- e) Cara uji pH sesuai Lampiran A.5;
- f) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.6
  - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.6.1
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.6.2
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.6.3
- g) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.7;
- h) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.8
  - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.8.1
  - Cara uji bakteri koliform sesuai Lampiran A.8.2
  - Cara uji kapang sesuai Lampiran A.8.3
- j) Cara uji Aflatoksin sesuai Lampiran A.9

## 8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu.

## 9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

## 10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## 11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Cara uji kecap kedelai manis**

**A.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

**A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

Buka kemasan contoh kecap kedelai manis dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 200 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

**A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik**

Buka kemasan contoh kecap kedelai manis dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia**

Buka kemasan contoh kecap kedelai manis dan ambil contoh sebanyak 200 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.2 Keadaan**

**A.2.1 Bau**

**A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

**A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".



## A.2.2 Rasa

### A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

### A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil contoh secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

### A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

## A.3 Kadar protein ( $N \times 6,25$ )

### A.3.1 Prinsip

Contoh didestruksi untuk melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi  $NH_3$  pada saat destilasi menggunakan NaOH.  $NH_3$  yang dibebaskan dan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,25.

### A.3.2 Peralatan

- Alat destilasi Kjeldahl konvensional atau otomatis;
- Alat destruksi;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik; dan
- Buret 10 mL terkalibrasi.

### A.3.3 Pereaksi

- Katalis tablet mengandung 3,5 g Kalium Sulfat ( $K_2SO_4$ ) dan 0,175 g Merkuri Oksida ( $HgO$ ), atau campuran Selen;
- Larutan indikator *methyl red* (MR) / *bromocresol green* (BCG);  
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 mL. Larutkan 0,2 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 100 mL. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- Larutan asam borat ( $H_3BO_3$ ) 4 %;  
timbang 4 g  $H_3BO_3$ , larutkan ke dalam air yang mengandung 0,7 mL larutan indikator *methyl red* 1 % *bromocresol green* 1 %, encerkan hingga 100 mL, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.



## SNI 3543.1:2013

- d) Larutan natrium hidroksida (NaOH) ;  
larutkan 30 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 100 mL, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- e) Larutan standar asam klorida, HCl 0,2 M;
- f) Larutan asam sulfat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat;
- g) Batu didih.

### A.3.4 Cara kerja

- a) Timbang secara teliti 1 sampai dengan 2 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl*, tambahkan 2 katalis tablet atau 1 g campuran katalis selen, 8 sampai dengan 10 batu didih dan 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat;
- b) panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- c) biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) tambahkan 50 sampai dengan 75 mL larutan NaOH 30% (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- e) suling selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 mL, dengan penampung destilat adalah 50 mL larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4 %;
- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,2 M; dan
- h) kerjakan penetapan blanko.

### A.3.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,25 \times 100\%}{W}$$

#### Keterangan:

- V<sub>1</sub> adalah volume HCl 0,2 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- V<sub>2</sub> adalah volume HCl 0,2 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- N adalah normalitas larutan HCl, dinyatakan dalam Normalitas (N);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);
- 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
- 6,25 adalah faktor protein untuk kecap.

### A.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

## A.4 Kadar gula (dihitung sebagai sakarosa)

### A.4.1 Prinsip

Sakarosa dihidrolisis menjadi gula pereduksi, gula reduksi seperti glukosa (dekstrosa), fruktosa, maltosa dan laktosa akan mereduksi larutan Luff menjadi Cu<sub>2</sub>O. Jumlah larutan



gula yang mereduksi larutan Luff ditentukan dengan cara titrasi dengan larutan natrium tio sulfat.

#### A.4.2 Peralatan

- Pemanas listrik;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Erlenmeyer 500 mL;
- Pipet volumetrik 10 mL, 25 mL dan 50 mL terkalibrasi;
- Labu ukur 100 mL dan 250 mL terkalibrasi;
- Penangas air;
- Pendingin tegak;
- Termometer terkalibrasi;
- Buret 50 mL terkalibrasi;
- Stopwatch.

#### A.4.3 Pereaksi

- Larutan Luff schoorl;  
Larutkan 143,8 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat dalam kira-kira 300 mL air suling. Sambil diaduk, tambahkan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dengan 100 mL air suling. Pindahkan larutan tersebut ke dalam labu 1 liter tepatkan sampai tanda garis dengan air suling dan kocok. Biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan  $\text{Cu}^{2+}$  0,2 N dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 M;
- Larutan kalium iodida, KI 20 %;
- Larutan asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 %;
- Larutan natrium tio sulfat,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N;
- Larutan asam klorida, HCl 25 %;
- Indikator kanji 0,5 %;
- Larutan natrium hidroksida, NaOH 4N;
- Larutan indikator fenolftalin;
- Larutan timbal asetat setengah basa atau larutan seng asetat; dan
- Larutan amonium hidrogen fosfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  10 % atau larutan kalium ferisianida.

#### A.4.4 Pengujian kepekatan larutan Luff

- Pipet 25 mL larutan luff tambahkan 3 g KI dan 25 mL larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M. Titar dengan larutan natrium tio sulfat 0,1 N dengan indikator kanji 0,5%. Larutan natrium tio sulfat yang digunakan untuk titrasi seharusnya 25 mL;
- Pipet 10 mL larutan luff, masukkan ke dalam labu ukur 100 mL, encerkan dengan air suling dan kocok;
- Pipet 10 mL larutan hasil pengenceran tersebut dan masukkan ke dalam erlenmeyer berisi 25 mL HCl 0,1 M;
- Masukkan erlenmeyer tersebut dalam penangas air mendidih dan biarkan selama 1 jam, kemudian angkat dan dinginkan;



- e) Encerkan dengan air suling dan titar dengan larutan NaOH 0,1M dengan indikator fenolftalin;
- f) Larutan NaOH 0,1 M yang dipergunakan untuk titrasi harus dipergunakan untuk titrasi harus disekitar 5,5 mL sampai dengan 6,5 mL;
- g) Pipet 10 mL larutan hasil pengenceran, masukkan ke dalam erlenmeyer dan titar dengan HCl 0,1 M dengan indikator fenolftalin Larutan HCl 0,1M yang dipergunakan untuk titrasi harus disekitar 6,0 mL sampai dengan 7,6 mL;
- h) Larutan luff harus mempunyai pH 9,3 sampai dengan 9,4.

#### A.4.5 Cara kerja

- a) Timbang secara seksama 2 g contoh (W) dan masukkan ke dalam labu ukur 250 mL, tambahkan air dan kocok;
- b) Tambahkan 5 mL Pb asetat setengah basa dan goyangkan;
- c) Teteskan 1 tetes larutan  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  10 % (bila timbul endapan putih maka penambahan Pb asetat setengah basa sudah cukup);
- d) Tambahkan 15 mL larutan  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  10 %. Untuk pengujian apakah Pb asetat setengah basa sudah diendapkan seluruhnya, teteskan 1 sampai dengan 2 tetes  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  10 %. Apabila tidak timbul endapan berarti penambahan  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  10 % sudah cukup;
- e) Goyangkan dan tepatkan isi labu ukur sampai tanda garis dengan air suling, kocok 12 kali biarkan dan saring;
- f) Pipet 50 mL hasil saringan pada penetapan gula pereduksi ke dalam labu ukur 100 mL;
- g) Tambahkan 25 mL HCl 25%, pasang termometer dan lakukan hidrolisis diatas penangas air. Apabila suhu mencapai 68 °C sampai dengan 70 °C suhu dipertahankan selama tepat 10 menit;
- h) Angkat dan bilas termometer dengan air lalu dinginkan;
- i) Tambahkan NaOH 30% sampai netral (warna merah jambu) dengan indikator fenolftalin. Tepatkan sampai tanda tera dengan air suling, kocok 12 kali;
- j) Pipet 10 mL larutan tersebut dan masukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL;
- k) Tambahkan 15 mL air suling dan 25 mL larutan luff (dengan pipet) serta beberapa butir batu didih;
- l) Hubungkan dengan pendingin tegak dan panaskan di atas pemanas listrik. Usahakan dalam waktu 3 menit sudah harus mulai mendidih. Panaskan terus sampai 10 menit (pakai stop watch). Angkat dan segera dinginkan dalam bak berisi es (jangan digoyang). Setelah dinginkan tambahkan 10 mL larutan KI 20 % dan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 % (hati-hati terbentuk gas  $\text{CO}_2$ );
- m) Titar dengan larutan tio 0,1 N dengan larutan kanji 0,5 % sebagai indikator ( $V_1$  mL); dan
- n) Lakukan juga penetapan blanko dengan 25 mL larutan luff. Kerjakan seperti di atas untuk larutan amonium hidrogen fosfat  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  10 % atau larutan kalium ferisianida.



#### A.4.6 Perhitungan

( $V_2 - V_1$ ) adalah volume larutan tio yang dibutuhkan oleh contoh dijadikan mL tio 0,1000 N, kemudian dalam Tabel A.1 dicari beberapa mg glukosa yang tertera untuk volume larutan tio yang digunakan (misalnya x mg)

$$\text{Gula total (dihitung sebagai sakarosa) (\%)} = \left( \frac{W_1 \times fp \times 0,95}{W} \right) \times 100 \%$$

#### Keterangan:

$W_1$  adalah bobot glukosa yang tertera pada tabel A.1 (sebagai sakarosa), dinyatakan dalam miligram (mg);

$W$  adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);

$fp$  adalah faktor pengenceran.

**Tabel A.1 - Penetapan gula menurut luff schoorl**

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,1N (mL)	Glukosa, Fruktosa Gula Inversi (mg)	Laktosa (mg)	Maltosa (mg)
1	2,4	3,6	3,9
2	4,8	7,3	7,8
3	7,2	11,0	11,7
4	9,7	14,7	15,6
5	12,2	18,4	19,6
6	14,7	22,1	23,5
7	17,2	25,8	27,5
8	19,8	29,5	31,5
9	22,4	33,2	35,5
10	25,0	37,0	39,5
11	27,6	40,8	43,5
12	30,3	44,6	47,5
13	33,0	48,6	51,6
14	35,7	52,2	55,7
15	38,5	56,0	59,8
16	41,3	59,9	63,9
17	44,2	63,8	68,0
18	47,1	67,7	72,2
19	50,0	71,1	76,5
20	53,0	75,1	80,9
21	56,0	79,8	85,4
22	59,1	83,9	90,0
23	62,2	88,0	94,6

#### A.4.7 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil kadar protein. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.



## **A.5 pH**

### **A.5.1 Prinsip**

Cara pengukuran pH menggunakan pH meter yang pada prinsipnya terdiri dari gabungan elektroda gelas hidrogen sebagai standar polimer dan *Referensi Elektroda Kalomel*. Pasangan elektroda ini akan menghasilkan perubahan tegangan 59,1 mv/pH unit pada 25 °C.

### **A.5.2 Peralatan**

- a) pH meter;
- b) Gelas elektroda;
- c) Pengaduk magnetik; dan
- d) Pengatur suhu contoh.

### **A.5.3 Cara kerja**

- a) Kalibrasi pH meter dengan larutan buffer pH 4 dan pH 7, lakukan setiap saat akan melakukan pengukuran;
- b) celupkan elektroda yang telah dibersihkan dengan air suling ke dalam contoh yang akan diperiksa. Suhu contoh pada saat pemeriksaan diatur pada suhu 25 °C;
- c) catat dan baca nilai pH pada skala pH meter yang ditunjukkan sampai satu desimal.

## **A.6 Cemarkan logam**

### **A.6.1 Kadmium (Cd) dan Timbal (Pb)**

#### **A.6.1.1 Prinsip**

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

#### **A.6.1.2 Peralatan**

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- g) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur 10 mL;
- i) Gelas piala 250 mL;



- j) Botol polipropilen;
- k) Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- l) Kertas saring tidak berabu dengan *particle retention* 20  $\mu\text{m}$  sampai dengan 25  $\mu\text{m}$ .

#### A.6.1.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) Asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat;
- c) Larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  0,1 N;  
encerkan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  6 N;  
encerkan 500 mL  $\text{HCl}$  pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- f) Larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- g) Larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau  $\text{HCl}$  6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,2  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,4  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,8  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,4  $\mu\text{g/mL}$  dan 1,8  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- i) Larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- j) Larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  Pb; dan  
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50  $\mu\text{g/mL}$ .
- k) Larutan baku kerja Pb;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau  $\text{HCl}$  6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,5  $\mu\text{g/mL}$  dan 2,0  $\mu\text{g/mL}$  PA.



**A.6.1.4 Cara kerja**

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur ( $450 \pm 5$ ) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes  $\text{HNO}_3$  pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu ( $450 \pm 5$ ) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL  $\text{HCl}$  6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan  $\text{HNO}_3$  0,1 N sebanyak 20 mL – 30 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

**A.6.1.5 Perhitungan**

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

**Keterangan:**

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

**A.6.1.6 Ketelitian**

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.



## A.6.2 Timah (Sn)

### A.6.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian tambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ .

### A.6.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

### A.6.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida ( $\text{KCl}$ ) 10 mg/mL K;  
larutkan 1,91 g  $\text{KCl}$  dengan air suling menjadi 100 mL.
- Asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) pekat;
- Asam klorida ( $\text{HCl}$ ) pekat;
- Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Sn; dan  
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL  $\text{HCl}$  pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.  
pipet 10 mL  $\text{HCl}$  pekat dan 1,0 mL larutan  $\text{KCl}$  ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 5  $\mu\text{g/mL}$ ; 10  $\mu\text{g/mL}$ ; 15  $\mu\text{g/mL}$ ; 20  $\mu\text{g/mL}$  dan 25  $\mu\text{g/mL}$  Sn.

### A.6.2.4 Cara kerja

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, keringkan dalam oven 120 °C, tambahkan 30 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan biarkan 15 menit (jangan tambahkan  $\text{HNO}_3$  ke dalam contoh jika tahapan destruksi tidak dapat diselesaikan dalam hari yang sama);
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;



- c) lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap  $\text{Cl}_2$  berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- f) tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL aquabides (V);
- g) tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbansi larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$ ;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh;

#### A.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

##### Keterangan:

C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ )

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.6.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

### A.6.3 Merkuri (Hg)

#### A.6.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbansi Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

#### A.6.3.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) *Microwave digester*;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;



- d) Pemanas listrik;
- e) Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- f) Tabung destruksi;
- g) Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- h) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- i) Gelas ukur 25 mL;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- k) Gelas piala 500 mL.

#### A.6.3.3 Pereaksi

- a) Larutan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 9 M;
- b) Larutan asam nitrat ( $\text{HNO}_3$ ) 7 M;
- c) Campuran asam nitrat: asam perklorat ( $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4$ ) 1:1;
- d) Hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pekat;
- e) Larutan natrium molibdat ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 2%;
- f) Larutan pereduksi;  
campurkan 50 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- g) Larutan natrium borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ );  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- h) Larutan pengencer;  
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL  $\text{HNO}_3$  kemudian tambahkan 67 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- i) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
larutkan 0,135 4 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- j) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  Hg; dan  
pipet 1 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- k) Larutan baku kerja Hg; dan  
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$  Hg.
- l) Batu didih.



#### A.6.3.4 Cara kerja

##### A.6.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M, 20 mL  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran asam nitrat: asam perklorat ( $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$ ) 1:1 melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

##### A.6.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;



- f) baca absorban larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

#### A.6.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

#### A.6.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

### A.7 Cemaran arsen (As)

#### A.7.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

#### A.7.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian  $1^\circ\text{C}$ ;
- c) *Microwave digester*;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Pemanas listrik;
- f) *Burner* atau *bunsen*;
- g) Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- h) Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- i) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- j) Gelas ukur 25 mL;
- k) Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;



- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- m) Cawan porselen 50 mL; dan
- n) Gelas piala 200 mL.

### A.7.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- b) Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- c) Asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- d) Ammonium oksalat,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- e) Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- f) Larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$  4 %;  
larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.
- g) Larutan asam klorida,  $\text{HCl}$  8 M;  
larutkan 66 mL  $\text{HCl}$  pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %;  
timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL  $\text{HCl}$  pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida,  $\text{KI}$  20 %;  
timbang 20 g  $\text{KI}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/mL;  
larutkan 3,75 g  $\text{MgO}$  dengan 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  As;  
larutkan 1,320 3 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit  $\text{NaOH}$  20 % dan netralkan dengan  $\text{HCl}$  atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100  $\mu\text{g/mL}$  As;  
pipet 10 mL larutan baku As 1 000  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  As.
- m) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As; dan  
pipet 1 mL larutan baku As 100  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  As.
- n) Larutan baku kerja As.  
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,05  $\mu\text{g/mL}$  As.



#### A.7.4 Cara kerja

##### A.7.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- Tambahkan 2 mL  $\text{HClO}_4$  70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan  $\text{HClO}_4$ , tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- Dinginkan, tambahkan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 mL  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- Panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- Dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- Pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL  $\text{HCl}$  8 M, 0,1 mL  $\text{KI}$  20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- Tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- Baca absorbansi larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- Lakukan pengerjaan duplo; dan
- Hitung kandungan As dalam contoh.

##### A.7.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat.
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu  $450\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 1$  jam);
- dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL  $\text{HCl}$  8 M, 0.1 mL  $\text{KI}$  20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan  $\text{HCl}$  dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;



## SNI 3543.1:2013

- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL; 0,03 µg/mL; 0,04 µg/mL; 0,05 µg/mL serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbansi tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbansi sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

### A.7.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

#### Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram
- fp adalah faktor pengenceran.

### A.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari

## A.8 Cemarkan mikroba

### A.8.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Coliform

#### A.8.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung

#### A.8.1.2 Peralatan

- a) Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- b) Otoklaf;
- c) Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- d) Pemanas listrik;
- e) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- f) Gelas piala steril;
- g) Erlenmeyer steril;
- h) Botol pengencer steril;
- i) Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- j) Tabung reaksi; dan



- k) Sendok, gunting, dan spatula steril.

#### A.8.1.3 Larutan Pengencer

*Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water*

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Air suling

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH

#### A.8.1.4 Homogenisasi contoh

- a) Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

### A.8.2 Bakteri Coliform

#### A.8.2.1 Prinsip

Pertumbuhan coliform ditandai dengan terbentuknya

#### A.8.2.2 Peralatan

- a. Inkubator ( $35 \pm 1$ ) °C, terkalibrasi;
- b. Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ( $45,5 \pm 0,2$ ) °C;
- c. Rak untuk tabung reaksi;
- d. Pipet ukur 10 mL berskala 1 mL dan 1 mL berskala 0,1 mL steril;
- e. Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f. Tabung reaksi
- g. Tabung *Durham*;
- h. Cawan petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- i. Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

#### A.8.2.3 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* / *Lauryl tryptose (LT) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2 %;
- c) *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;

#### A.8.2.4 Cara kerja

##### A.8.2.4.1 APM – Uji pendugaan untuk coliform

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.9.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dan  $10^{-3}$ ) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;



- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $35 \pm 2$  °C selama  $(48 \pm 2)$  jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- $(24 \pm 2)$ . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

#### A.8.2.4.2 APM – Uji penegasan untuk coliform

- a) Pindahkan satu Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* yang berlainan,
- b) inkubasikan tabung-tabung BGLB *broth* tersebut ke dalam inkubator pada suhu  $(35 \pm 1)$  °C selama  $(24 \pm 2)$  jam, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif",
- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- $(48 \pm 2)$ . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif", dan
- d) Hitunglah APM coliform dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung coliform

**Tabel A.2 – APM/g contoh bila menggunakan 3 tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan**

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75

**Tabel A.2 – (lanjutan)**

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150



2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	110
2	1	2	27	3	3	3	>110

### A.8.3 Kapang

#### A.8.3.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai

#### A.8.3.2 Peralatan

- Inkubator ( $25 \pm 1$ ) °C, terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air ( $45 \pm 1$ ) °C;
- pH meter;
- Alat penghitung koloni;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL, steril; dan
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

#### A.8.3.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- Agar dichloran 18% glycerol (DG 18);
- Larutan pepton 0,1%
  - pepton 1 g
  - Air suling 1 000 mL

Larutkan pepton dalam air suling kemudian

- Larutan antibiotik:

Antibiotik ditambahkan di media kapang untuk

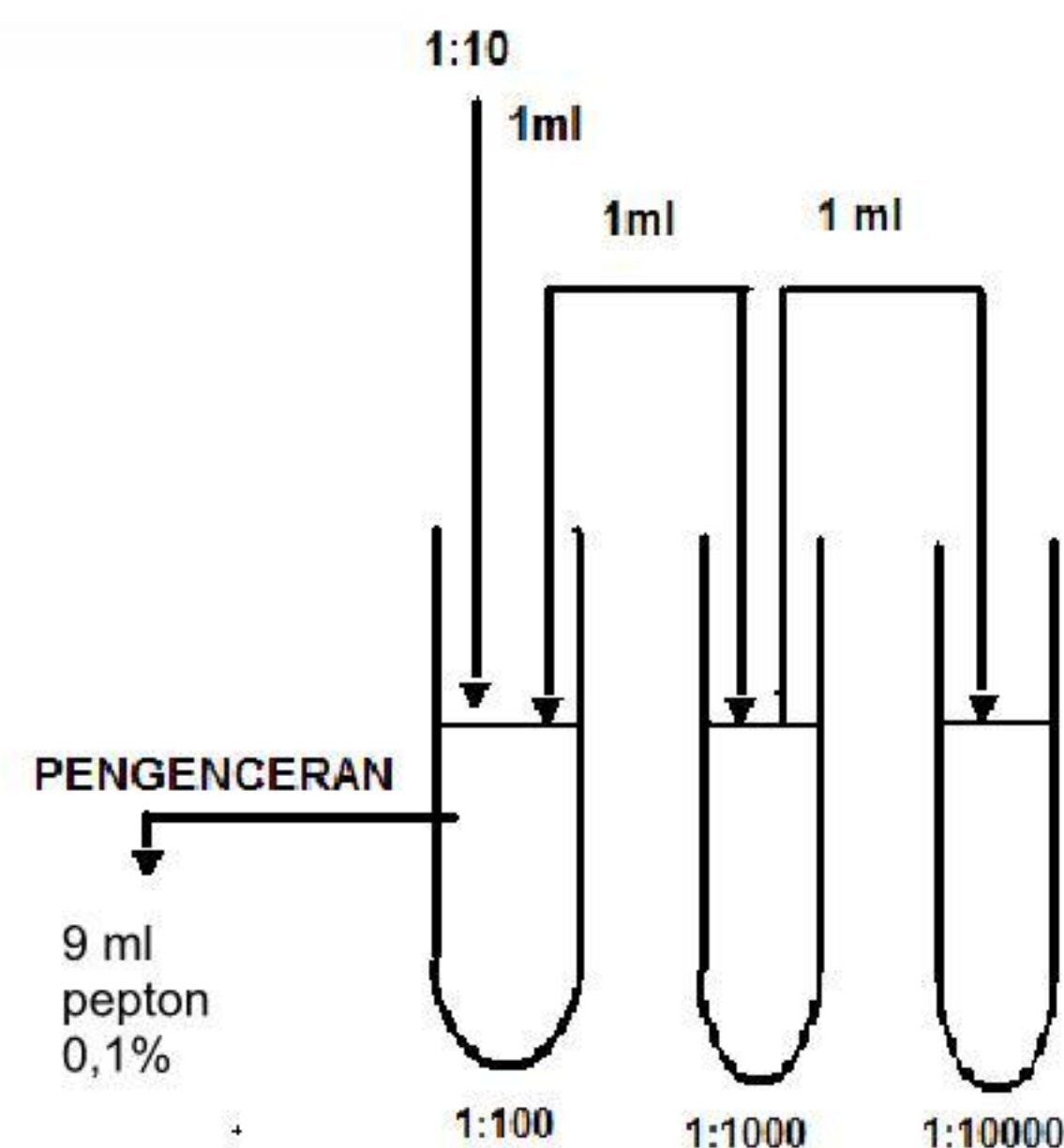
#### A.8.3.4 Persiapan dan Homogenisasi Contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1% steril sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- Kocok campuran beberapa kali hingga homogen

#### A.8.3.5 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran dari  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-4}$  seperti pada Gambar A.2 dengan menggunakan larutan pepton 0,1%





Gambar A.2 - Tingkat pengenceran

- b) persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan metode tuang (media DG 18):
  - pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
  - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
  - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- c) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- d) hitung koloni yang tumbuh pada cawan setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu selama 48 jam. Jangan menghitung koloni dalam cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder spora; dan
- e) nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

#### A.8.3.6 Perhitungan

$$\text{Kapang (koloni/g)} = n \times F$$

##### Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata

#### A.8.3.7 Pernyataan hasil

##### A.8.3.7.1 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;

contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530

- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan

contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520

- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:







e) tampung 2 mL hasil elusi metanol dari IAC.

#### A.9.4.3 Prosedur Derivatisasi

##### A.9.4.3.1 Derivatisasi Contoh Uji

- Pipet eluat 2 mL, evaporasi dengan nitrogen;
- larutkan dengan 200 µL asetonitril;
- tambahkan 700 µL campuran larutan penderivatisasi (10 mL TFA, 5 mL asam asetat, 35 mL akuades);
- diamkan selama 9 menit pada suhu 65 °C;
- evaporasi dengan nitrogen;
- larutkan residu dengan 200 µL *mobile phase* (air : asetonitril : metanol dengan perbandingan 60 : 20 : 20);
- injeksikan 20 µL aliquat (A) ke KCKT.

##### A.9.4.3.2 Derivatisasi Baku

- Pipet baku campuran 200 ng / mL sebanyak 5 µL, 10 µL, 20 µL, 40 µL, dan 50 µL;
- uapkan pelarut dengan nitrogen hingga terbentuk residu;
- tambahkan residu dengan 50 µL TFA kemudian vorteks selama 30 detik;
- tambahkan dengan 950 µL campuran asetonitril dan air (9 : 1) kemudian vorteks selama 30 detik;
- injeksikan 20 µL aliquat (A) ke KCKT.

#### A.9.5 Cara Penetapan

Larutan A dan B masing-masing disuntikkan

- Kolom STR ODS-II (panjang kolom 25 cm, diameter dalam 4,6 mm) atau yang sesuai
- Fase gerak : asetonitril- metanol – air (20 : 20: 60)
- Laju alir : 0,8 mL per menit
- Detektor : Fluoresens, λ Eksitasi sebesar 366 nm dan λ Emisi sebesar 440 nm
- Volume penyuntikan : masing-masing 20 µL

#### A.9.6 Interpretasi Hasil

Kadar Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, dan G<sub>2</sub> dalam larutan

$$\text{Kadar aflatoksin B}_1, \text{B}_2, \text{G}_1, \text{dan G}_2 = \frac{C_{sp}}{W} \times F$$

##### Keterangan:

- C<sub>sp</sub> adalah kadar aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, dan G<sub>2</sub> yang diperoleh dari perhitungan menggunakan kurva kalibrasi (ng/mL) ;
- F adalah faktor pengenceran; dan
- W adalah bobot sampel (g).



## Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC Official Method 920.176, *Nitrogen in Sugars and Syrups*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 44.1.06.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 923.09, *Invert Sugar in Sugar and Syrups*, 17<sup>th</sup> Edition, Chapter 44.1.08.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC Official Method 971.21, *Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC Official Method 974.14, *Mercury in Fish, Alternative Digestion Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.24.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC Official Method 985.16, *Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC Official Method 986.15, *Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. AOAC Official Method 999.11, *Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2002. AOAC Official Method 2000.01, *Determination of 3-chloro-1,2-propanediol in foods and food ingredients by gas chromatografi with mass spectrometric detection*, 17<sup>th</sup> Edition, Chapter 48.1.06.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Sobolev, V.S. 2007. Simple, Rapid, and Inexpensive Cleanup Method for Quantitation of Aflatoxins in Important Agricultural Products by HPLC. *Journals of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2136 – 2141.
- SNI 7387: 2009. Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan
- SNI 7388 : 2009. Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.